

DOCKET NO.: 279057US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Kunio KAMATA, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP04/04687

INTERNATIONAL FILING DATE: March 31, 2004

FOR: DILUENT FOR NOROVIRUS OR SAPOVIRUS SPECIMEN AND METHOD FOR
DETECTING VIRUS

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313


Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that
the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
Japan	2003-095349	31 March 2003

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the
International Bureau in PCT Application No. PCT/JP04/04687. Receipt of the certified
copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been
acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Customer Number

22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

PCT/JP 2004/004687

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

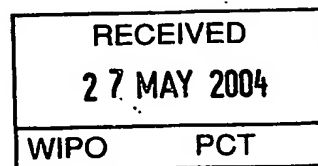
31. 3. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 3 月 3 1 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 9 5 3 4 9
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 9 5 3 4 9]



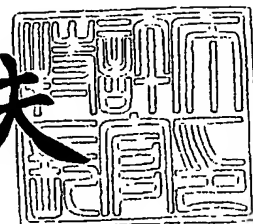
出 願 人 デンカ生研株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 5 月 1 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 3 9 7 3 1

【書類名】 特許願

【整理番号】 P01331503

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

 【住所又は居所】 新潟県五泉市南本町 1-2-2 デンカ生研株式会社内

 【氏名】 鎌田 公仁夫

【発明者】

 【住所又は居所】 新潟県五泉市南本町 1-2-2 デンカ生研株式会社内

 【氏名】 加藤 大介

【特許出願人】

 【識別番号】 591125371

 【氏名又は名称】 デンカ生研株式会社

【代理人】

 【識別番号】 110000084

 【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所

 【代表者】 有賀 三幸

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 164232

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ノロウイルス又はサポウイルス検体用希釈液及びウイルス検出試薬

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 pH9.0～10.0のアルカリ性緩衝剤を含有するノロウイルス又はサポウイルス検体用希釈液。

【請求項 2】 さらに動物グロブリンを含有する請求項 1 記載の検体用希釈液。

【請求項 3】 さらに界面活性剤を含有する請求項 1 又は 2 記載の検体用希釈液。

【請求項 4】 さらに水溶性高分子を含有する請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の検体用希釈液。

【請求項 5】 塩濃度が 1～8 質量%である請求項 1～4 のいずれか 1 項記載の検体用希釈液。

【請求項 6】 抗ノロウイルス抗体又は抗サポウイルス抗体及び請求項 1～5 のいずれか 1 項記載の検体用希釈液を含有するノロウイルス又はサポウイルス検体用試薬。

【請求項 7】 さらに標識抗ノロウイルス抗体又は標識サポウイルス抗体を含有する請求項 6 記載の検出試薬。

【請求項 8】 検体に請求項 1～5 のいずれか 1 項記載の検体用希釈液を加え、得られた検体含有液を固定化された抗ノロウイルス抗体又は抗サポウイルス抗体と反応させることを特徴とする検体中のノロウイルス又はサポウイルスの検出方法。

【請求項 9】 前記検体含有液に、固定化された抗ノロウイルス抗体又は抗サポウイルス抗体と標識抗ノロウイルス抗体又は標識抗サポウイルスとを同時に反応させる請求項 8 記載の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、便、嘔吐物、体液、血液、体組織、食品等の検体中のノロウイルス又はサポウイルスを免疫学的測定法により検出する際の検出感度を向上させるための手段及び非特異的反応を除去するための手段に関する。

【0002】

【従来の技術】

ノロウイルス (Norovirus(旧名称 Norwalk virus)) 及びサポウイルス (Sapovirus(旧名称 Sapporo virus)) のヒトカリシウイルスに属するウイルスは、ヒトに急性胃腸炎を起こすため、これらのウイルスを検出するための検体は、糞便の場合が多い。一般的に、糞便を検体に用いたELISA等では検出感度が低く、また非特異的反応も多いことから、結果の判定に苦慮していた。検出感度を向上させるための手段としては、抗原に反応性の高い抗体を見出す等の手段があるが、そのような抗体の作製は困難である。また、糞便検体から非特異的反応を除去する方法として前処理法として行われていた。例えば、遠心分離して非特異因子を沈殿除去する方法、有機溶剤等を用いた脂質の除去法があるが、これらの方法は煩雑であり遠心分離機という特別な機器が必要であった。また、界面活性剤を加えた緩衝液で検体を懸濁する方法があるが、これらの方法は、非特異反応を完全に除去した場合には特異反応も低下したり、特異反応を低下させない場合は非特異反応が完全に除去しきれないという問題があった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、糞便、嘔吐物、体液、血液、体組織、食品等のノロウイルス又はサポウイルス含有検体から、簡便で、遠心分離機等の特別な機器を必要とすることなく、検出感度を向上させる手段、また特異反応を向上させ、かつ非特異因子を完全に除去する手段が望まれていた。

【0004】

【課題を解決するための手段】

そこで本発明者は、糞便等の検体を用いた免疫学的方法によるノロウイルス又はサポウイルスの検出法について種々検討した結果、検体をpH9.0～10.0のアルカリ性緩衝剤を含有する検体希釈液で処理すれば、簡便に検出感度が向上

することを見出した。また、この検体希釈液に動物グロブリン、界面活性剤、水溶性高分子等を添加するか、塩濃度の至適化をすれば、遠心分離等の操作をすることなく、非特異的反応も除去でき、正確なノロウイルス又はサポウイルスの免疫学的測定が可能となることを見出した。

【0005】

すなわち、本発明は、pH9.0～10.0のアルカリ性緩衝剤を含有するノロウイルス又はサポウイルス検体用希釈液を提供するものである。

また本発明は、pH9.0～10.0のアルカリ性緩衝剤及び動物グロブリン、界面活性剤又は水溶性高分子を含有するノロウイルス又はサポウイルス検体用希釈液を提供するものである。

また本発明は、抗ノロウイルス抗体又は抗サポウイルス抗体及び上記ノロウイルス又はサポウイルス検体用希釈液を含有するノロウイルス又はサポウイルス検出試薬を提供するものである。

さらに、本発明は、検体に上記ノロウイルス又はサポウイルス検体用希釈液を加え、得られた検体含有液を固定化された抗ノロウイルス抗体又は抗サポウイルス抗体と反応させることを特徴とする検体中のノロウイルス又はサポウイルスの検出方法を提供するものである。

【0006】

【発明の実施の形態】

本発明における検体は、ノロウイルス又はサポウイルスの存在が疑われる糞便、嘔吐物、食品、体液、血液、体組織等であり、このうち糞便、嘔吐物、食品が好ましく、特に糞便が好ましい。

【0007】

本発明における検出対象は、ノロウイルス又はサポウイルスであるが、特にノロウイルスが好ましい。

【0008】

本発明のノロウイルス又はサポウイルス検体用希釈液に用いられるアルカリ性緩衝剤は、pH9.0～10.0の緩衝液を形成できるものである。pH9.0未満及びpH10.0を超えた緩衝液では検出感度が十分に向上しない。

【0009】

pH9.0～10.0の緩衝液としてはトリス緩衝液、グッド緩衝液、ホウ酸塩緩衝液、炭酸塩緩衝液が挙げられるが、トリス緩衝液、グッド緩衝液が特に好ましい。

【0010】

本発明において検体をpH9.0～10.0の緩衝液で希釈することにより検出感度が向上する理由は、明らかではないが、ウイルス粒子の開裂が起こり、ウイルス粒子内部のエピトープが露出され、抗原抗体反応が向上することによると考えられる。すなわち、例えばノロウイルスの株間共通エピトープはウイルス粒子の内部にあり、通常そのエピトープは粒子外部に露出されていない。pH9.0～10.0のアルカリ緩衝液処理を行うことにより、ウイルス粒子中の株間エピトープが露出されることにより、反応性が向上し、検出感度が向上する。

【0011】

また、前記検体用希釈液には、動物グロブリンを0.01～1.0mg/mL、さらに0.01～0.5mg/mL、特に0.05～0.5mg/mL含有させるのが、非特異的反応を効率良く除去するうえで好ましい。ここで動物グロブリンとしては、マウス、ウサギ、ヒツジ又はヒト由来のグロブリンが好ましい。

【0012】

また、前記検体用希釈液には、界面活性剤を含有させるのが、非特異的反応を効率良く除去するうえで好ましい。用いられる界面活性剤としては、非イオン性界面活性剤、両イオン性界面活性剤が好ましい。非イオン性界面活性剤としては、ポリエチレングリコールモノ-p-イソオクチルフェニルエーテル (Triton X 100) 等のポリエチレングリコールアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween 20) 等のポリオキシエチレンソルビタンモノ脂肪酸エステルが挙げられる。両イオン性界面活性剤としては、3-[(3-コラシドプロピル)ジメチルアミノ]1-プロパンスルホネート (CHAPS) 等のスルホベタイン型両イオン性界面活性剤が挙げられる。これらの界面活性剤は、非特異的反応除去効果の点から検体用希釈液中に0.01～5.0質量%、特に0.02～2.0質量%含有するのが好ましい。ポリエチレングリコールアル

キルフェニルエーテルの場合には0.5～5.0質量%、特に1.0～2.0質量%が好ましい。またポリオキシエチレンソルビタンモノ脂肪酸エステルの場合には0.01～0.1質量%、特に0.02～0.08質量%が好ましい。また、スルホベタイン型両イオン性界面活性剤の場合には0.05～2.0質量%、特に0.1～0.5質量%が好ましい。

【0013】

また前記検体用希釈液には、水溶性高分子を含有させるのが、非特異的反応を効率良く除去するうえで好ましい。用いられる水溶性高分子としては、ポリビニルピロリドン (PVP)、デキストラン硫酸、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール等が挙げられ、このうちポリビニルピロリドンが特に好ましい。これらの水溶性高分子は、非特異的反応除去効果の点から、0.1～8.0質量%、特に0.2～5.0質量%含有するのが好ましい。

【0014】

また前記検体用希釈液には、血清アルブミン、特に牛胎児血清アルブミン (BSA) を含有させるのが好ましい。血清アルブミンは、0.1～1.0質量%、特に0.5質量%含有させるのが好ましい。

【0015】

また、さらに検体用希釈液中の塩濃度を1～8質量%、特に2～4質量%とすると、非特異的反応の除去効果がさらに向上する。当該塩濃度は、前記アルカリ性緩衝剤の塩濃度を含めた濃度である。塩としては、NaCl、KCl等のアルカリ金属塩、CaCl₂等のアルカリ土類金属塩、さらにはアルギニン塩酸塩等のアミノ酸塩等が用いられる。

【0016】

検体を検体用希釈液で処理するには、検体に検体用希釈液を加え、5分以上、より好ましくは10分以上、さらに好ましくは10分～2時間放置すればよい。処理温度は4～37℃、特に20～25℃が好ましい。当該処理後に、抗ノロウイルス抗体又は抗サポウイルス抗体を用いた通常の免疫学的測定をすれば、検出感度が向上し、また非特異的反応が除去され、正確にノロウイルス又はサポウイルスの検出が可能となる。

【0017】

ノロウイルス又はサポウイルスの検出方法は、抗ノロウイルス抗体又は抗サポウイルス抗体を用いた免疫学的測定法であれば特に制限されないが、抗ノロウイルス抗体又は抗サポウイルス抗体と標識抗ノロウイルス抗体又は標識抗サポウイルス抗体を用いたサンドイッチ法がより好ましい。また、固定化抗ノロウイルス抗体又は固定化抗サポウイルス抗体と標識抗ノロウイルス抗体又は標識抗サポウイルス抗体を用いる方法がさらに好ましい。

【0018】

抗ノロウイルス抗体又は抗サポウイルス抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれでもよい。モノクローナル抗体としては、例えば、第47回日本ウイルス学会(1999年11月7日)、Virology, Vol. 217, 252-261(1996)、J. Clin. Microbiol., Vol. 38, 1656-1660(2000)、J. Clin. Microbiol., Vol. 40, 2459-2465(2002)、特開2002-20399号、特開2002-17397号に記載のノロウイルスに対するモノクローナル抗体が用いられる。またポリクローナル抗体としては、再公表特許WO00/079280に記載のノロウイルスに対するポリクローナル抗体が用いられる。

【0019】

これらの抗体は、ポリスチレンプレート、ラテックス粒子、磁性粒子、ガラス繊維膜、ナイロン膜、ニトロセルロース膜、酢酸セルロース膜等の不溶性支持体に固定化するのが好ましい。

【0020】

また、標識抗ノロウイルス抗体又は標識抗サポウイルス抗体の標識体としては、公知の標識体、例えば、放射性同位体(例えば、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^3H)、酵素(例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ルシフェラーゼ)、タンパク(例えば、アビジン)、低分子化合物(例えば、ビオチン)、蛍光物質(例えば、FITC)、化学発光物質(例えば、アクリジニウム)、ラテックス粒子(例えば、着色ラテックス粒子、蛍光ラテックス粒子)、金属(例えば、金、銀、白金等の貴金属)コロイド粒子、炭素原子等を用いることができる。

【0021】

検体中のノロウイルス又はサポウイルスの検出は、検体に前記検体用希釈液を加え、得られた検体含有液に固定化された抗体と反応させることにより行われる。サンドイッチ法による場合には、通常該検体含有液と固定化された抗体を反応させ、次いで前記標識抗体を反応させることにより行われるが、本発明の前記検体希釈液で処理された検体含有液を用いる場合には、固定化された抗体と標識抗体とを同時に反応させても正確な測定が可能である。当該同時法の操作は、抗ノロウイルス抗体又は抗サポウイルス抗体が固相化されているプレートに希釈検体を加え、直ちに標識抗体を加えることにより行われる。この同時法は、通常法が、抗体固相化プレートに希釈検体を加えて反応させ、洗浄後標識抗体を加える操作を行うのとは異なる。本発明では、この同時法を用いることにより通常法よりも簡便に測定できるだけでなく非特異反応も軽減される。

【0022】

反応終了後、検体中のノロウイルス又はサポウイルスと固定化抗体と標識抗体とで形成された複合体中の標識量を測定すれば、検体中のノロウイルス又はサポウイルス量が測定できる。標識量の測定は、標識体の種類に応じた手段で行うことができる。例えば、標識として酵素、アビジンを用いた場合には、反応後、基質を加え、酵素活性を測定する。また、標識として蛍光（蛍光ラテックス粒子を含む）又は化学発光物質を用いた場合には、消光が起こらない条件で信号を測定する。着色ラテックス粒子、金属コロイド粒子、及び炭素粒子等は、目視或いは反射光等で信号を測定する。

【0023】

本発明の検出方法としてはELISA及びイムノクロマトグラフ法がより好ましく、特にELISAが好ましい。

【0024】

本発明の検出試薬は、基本的に前記検体用希釈液及び前記抗体により構成されるが、これに前記標識抗体を含めるのが好ましい。より具体的には、前記検体用希釈液、固定化抗ノロウイルス抗体又は固定化抗サポウイルス抗体、及び標識抗ノロウイルス抗体又は標識抗サポウイルス抗体により構成されるのが好ましい。

【0025】

【実施例】

次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。

【0026】**実施例1 アルカリ性緩衝液による感度向上**

ノロウイルスの遺伝子型I (GenogroupI:GI) を広く認識する抗ノロウイルスモノクローナル抗体NV3912 (J. Clin. Microbiol., Vol. 38, 1656-1660(2000))、ノロウイルスの遺伝子型II (GenogroupII:GII) を広く認識する抗ノロウイルスモノクローナル抗体NS14 (J. Clin. Microbiol., Vol. 40, 2459-2465(2002)) を炭酸バッファー (pH9.4) で各々 5 μ g/mL濃度に希釈し、ポリスチレン平型マイクロプレート (ヌンク社製) に 100 μ l/ウェルで分注し、4℃で一晩静置した。18時間以上静置後、最終濃度 0.05% Tween20 を含む 10mM PBS 200 μ l/ウェルでマイクロプレートを2回洗浄し、最終濃度 0.5%牛血清アルブミン(BSA) と 0.05% Tween20 を含む 10mM PBS (pH7.2) 200 μ l/ウェル加えて4℃一晩静置して、抗ノロウイルスモノクローナル抗体固相マイクロプレートを作製した。

【0027】

GIに属するノロウイルス124株の組換え抗原、GIIに属するノロウイルス1876株の組換え抗原にアルカリ緩衝液 (20mMTris-HCl pH9.0、0.5%BSA、0.05%Tween20) 又は中性緩衝液 (PBS pH7.2、0.5%BSA、0.05%Tween20) を加え、抗原濃度 0.1、1.0、10.0 ng/mLに希釈した抗原液を10分間又は60分間静置した。

【0028】

この抗原希釈液を、GI組換えノロウイルス抗原 (124株) は抗ノロウイルスモノクローナル抗体NV3912固相マイクロプレートのウェルに、GII組換えノロウイルス抗原 (1876株) は抗ノロウイルスモノクローナル抗体NS14固相マイクロプレートのウェルに100 μ l加え、25℃で1時間反応させた。反応後、ウェルの反応液を吸引除去し、最終濃度 0.05% Tween20 を含む 10mM PBS (pH7.2) をウェルに200 μ l加え、同様に吸引除去した。この操作を少なく

とも3回行った。最終濃度0.5% BSA 及び0.05% Tween20 を含む10mM PBS (pH7.2) で至適濃度に希釈したPOD標識抗GIノロウイルスポリクローナル抗体をGI組換え抗原希釈液が入っているウェルに、POD標識抗GIIポリクローナル抗体をGII組換え抗原希釈液が入っているウェルに加え、25℃、1時間反応させた。反応後、ウェルの反応液を吸引除去し、最終濃度0.05% Tween20 を含む10mM PBS (pH7.2) をウェルに200 μ l加え、同様に吸引除去した。この操作を少なくとも5回行った。次いで過酸化水素を含むTMB溶液を100 μ l/ウェル加え、室温で30分間反応させた。反応後0.6Nの硫酸を100 μ l/ウェル加え、ELISAオートリーダーでウェルの吸光度(450nm/630nm)を測定した。

【0029】

【表1】

NV3912

	反応時間	10分		60分	
	緩衝液pH	pH7.2	pH9.0	pH7.2	pH9.0
124株 ng/mL	10.0	0.712	1.995	0.602	1.991
	1.0	0.108	0.253	0.095	0.228
	0.1	0.045	0.047	0.049	0.048
	BLK	0.047	0.079	0.049	0.048

NS14

	反応時間	10分		60分	
	緩衝液pH	pH7.2	pH9.0	pH7.2	pH9.0
1876株 ng/mL	10.0	1.067	4.619	1.032	5.937
	1.0	0.140	1.173	0.138	0.817
	0.1	0.032	0.121	0.034	0.102
	BLK	0.022	0.023	0.023	0.027

【0030】

表1から、緩衝液のpHが9.0以上の場合、pH7.2に比べ約2倍以上の吸光度上昇が見られた。この吸光度の上昇は、反応時間60分間でも見られ、株によっては反応時間が長い方が吸光度の上昇が大きかった。

【0031】

実施例2 界面活性剤の効果

界面活性剤としてTriton X100を0、1、2、3%となるようにアルカリ緩衝液に加えて検体希釈液を作製した。

【0032】

ノロウイルス患者便(0.5~1.0g)に各検体希釈液10mLをそれぞれ加え、懸濁後10分間静置し、その上清を取り10%便懸濁液とした。この10%便懸濁液を抗ノロウイルスモノクローナル抗体固相マイクロプレートのウェルに100 μ l加え、25℃で1時間反応させた。反応後、ウェルの反応液を吸引除去し、最終濃度0.05% Tween20を含む10mM PBS (pH7.2)をウェルに200 μ l加え、同様に吸引除去した。この操作を少なくとも3回行った。その後最終濃度0.5% BSA 及び0.05% Tween20を含む10mM PBS (pH7.2)で至適濃度に希釈したPOD標識抗ノロウイルスポリクローナル抗体をウェルに加え、25℃1時間反応させた。反応後、ウェルの反応液を吸引除去し、最終濃度0.05% Tween20を含む10mM PBS (pH7.2)をウェルに200 μ l加え、同様に吸引除去した。この操作を少なくとも5回行った。次いで過酸化水素を含むTMB溶液を100 μ l/ウェル加え、室温で30分間反応させた。反応後0.6Nの硫酸を100 μ l/ウェル加え、ELISAオートリーダーでウェルの吸光度(450nm/630nm)を測定した。

【0033】

【表 2】

NV3912

検体	界面活性剤	TritonX100			
	濃度	0%	1%	2%	3%
ノロウイルス感染 患者便	124	0.498	0.422	0.378	0.490
	258	2.335	2.718	2.750	3.239
	18-3	0.107	0.015	0.015	0.018
	1876	0.105	0.015	0.022	0.019
健常人 便検体	D10	0.114	0.034	0.042	0.045
	D12	0.134	0.014	0.015	0.014
	D16	0.100	0.023	0.028	0.029
	BLK	0.049	0.033	0.039	0.041

NS14

検体	界面活性剤	TritonX100			
	濃度	0%	1%	2%	3%
ノロウイルス感染 患者便	124	0.224	0.045	0.048	0.053
	258	0.202	0.044	0.043	0.045
	18-3	0.254	0.182	0.181	0.190
	1876	1.840	1.639	2.071	1.788
健常人 便検体	D10	0.463	0.114	0.133	0.138
	D12	0.312	0.033	0.034	0.036
	D16	0.211	0.066	0.065	0.068
	BLK	0.097	0.113	0.127	0.132

【0034】

表 2 から、NV3912 固相プレートを用いた場合、界面活性剤を含まない検体希釈液で調製した便懸濁液は、健常人の便検体及び GII に分類されるノロウイルスに感染した患者便に対して、吸光度がブランクに比べ高く非特異反応が見られた。しかし、1%以上の TritonX100 を添加した検体希釈液で調製した場合、健常人及び GII 感染患者の吸光度はブランク並となり、非特異反応の軽減が見られた。同様に、NS14 固相プレートを用いた場合、健常人及び GI 感染患者の吸光度はブランク以下となり、非特異反応の軽減が見られた。

【0035】

実施例 3 マウスグロブリンの効果

界面活性剤として Triton X100 を 1% 含むアルカリ緩衝液に、マウスグロブリンを 0、0.1、0.01、0.001 mg/mL 加えて検体希釈液を作製した。

【0036】

ノロウイルス患者便 (0.5~1.0 g) に各検体希釈液 10 mL をそれぞれ加え、懸濁後 10 分間静置し、その上清を取り 10 % 便懸濁液とした。この 10 % 便懸濁液を抗ノロウイルスモノクローナル抗体固相マイクロプレートのウェルに 100 μ l 加え、25 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。反応後、ウェルの反応液を吸引除去し、最終濃度 0.05 % Tween20 を含む 10 mM PBS (pH 7.2) をウェルに 200 μ l 加え、同様に吸引除去した。この操作を少なくとも 3 回行った。次いで最終濃度 0.5 % BSA 及び 0.05 % Tween20 を含む 10 mM PBS (pH 7.2) で至適濃度に希釈した POD 標識抗ノロウイルスポリクローナル抗体を加え、25 $^{\circ}$ C 1 時間反応させた。反応後、ウェルの反応液を吸引除去し、最終濃度 0.05 % Tween20 を含む 10 mM PBS (pH 7.2) をウェルに 200 μ l 加え、同様に吸引除去した。この操作を少なくとも 5 回行った。次いで過酸化水素を含む TMB 溶液を 100 μ l/ウェル加え、室温で 30 分間反応させた。反応後 0.6 N の硫酸を 100 μ l/ウェル加え、ELISA オートリーダーでウェルの吸光度 (450 nm/630 nm) を測定した。

【0037】

【表 3】

NV3912

検体	グロブリン	マウスグロブリン画分			
	濃度 mg/mL	0	0.1	0.01	0.001
ノロウイルス感染 患者便	258	5.942	4.812	4.254	4.364
	1876	0.075	0.039	0.044	0.066
健常人 便検体	D10	0.064	0.035	0.038	0.038
	D16	0.074	0.038	0.037	0.033
	BLK	0.075	0.036	0.045	0.054

NS14

検体	グロブリン	マウスグロブリン画分			
	濃度 mg/mL	0	0.1	0.01	0.001
ノロウイルス感染 患者便	258	0.080	0.038	0.040	0.074
	1876	2.110	2.102	2.114	2.143
健常人 便検体	D10	0.044	0.036	0.039	0.043
	D16	0.041	0.020	0.024	0.032
	BLK	0.056	0.030	0.027	0.057

【0038】

表3から、マウスグロブリンを添加した検体希釈液を用いた場合、GIIに分類されたノロウイルス感染患者便、健常人便検体、ブランクの吸光度は、マウスグロブリンを添加しない検体希釈液を用いた場合よりも最大で約2倍吸光度が低くなっている。NS14固相プレートを用いた場合も同様に、マウスグロブリンを添加した方が無添加よりも吸光度が低くなっている。このことは、マウスグロブリン画分を添加した方が非特異反応を軽減できると考えられた。

【0039】

実施例4 塩濃度の至適化

マウスグロブリンを0.1mg/mL、Triton X100を1%含むアルカリ緩衝液の塩濃度を、1、2、8%加えて検体希釈液を作製した。

【0040】

ノロウイルス患者便(0.5~1.0g)に各検体希釈液10mLをそれぞれ加え、懸濁後10分間静置し、その上清を取り10%便懸濁液とした。この10%便懸濁液を抗ノロウイルスモノクローナル抗体固相マイクロプレートのウェルに

100 μ l 加え、25℃で1時間反応させた。反応後、ウェルの反応液を吸引除去し、最終濃度0.05% Tween20 を含む10mM PBS (pH7.2) をウェルに200 μ l 加え、同様に吸引除去した。この操作を少なくとも3回行った。最終濃度0.5% BSA 及び0.05% Tween20 を含む10mM PBS (pH7.2) で至適濃度に希釈したPOD標識抗ノロウイルスポリクローナル抗体をウェルに加え、25℃1時間反応させた。反応後、ウェルの反応液を吸引除去し、最終濃度0.05% Tween20 を含む10mM PBS (pH7.2) をウェルに200 μ l 加え、同様に吸引除去した。この操作を少なくとも5回行った。次いで過酸化水素を含むTM B溶液を100 μ l/ウェル加え、室温で30分間反応させた。反応後0.6Nの硫酸を100 μ l/ウェル加え、ELISAオートリーダーでウェルの吸光度(450nm/630nm)を測定した。

【0041】

【表4】

NaCl 1%

検体	プレート	NV3912	NS14
ノロウイルス感染患者便	124	0.712	0.026
	1876	0.011	0.369
健常人便検体	D10	0.086	0.109
	BLK	0.024	0.090

NaCl 2%

検体	プレート	NV3912	NS14
ノロウイルス感染患者便	124	0.726	0.021
	1876	0.010	0.414
健常人便検体	D10	0.017	0.055
	BLK	0.028	0.087

NaCl 8%

検体	プレート	NV3912	NS14
ノロウイルス感染患者便	124	0.534	0.039
	1876	0.011	0.325
健常人便検体	D10	0.014	0.038
	BLK	0.032	0.057

【0042】

表4から、ノロウイルス感染患者便の反応性に影響が少なく、健常人便検体の反応性を軽減する検体希釈液の塩濃度は最終2%であると考えられた。

【0043】

実施例5 水溶性高分子の効果

アルカリ緩衝液に水溶性高分子であるポリビニルピロリドン (PVP) を最終濃度0.2、1.0、5.0%になるように加えて検体希釈液を作製した。

【0044】

ノロウイルス組換え抗原に各検体希釈液を加え(1ng/mL)10分間静置し抗原希釈液とした。また健常人の糞便(0.5~1.0g)に各検体希釈液10mLをそれぞれ加え、懸濁後10分間静置し、その上清を取り10%便懸濁液とした。この希釈抗原液及び10%便懸濁液を抗ノロウイルスモノクローナル抗体固相マイクロプレートのウェルに100 μ l加えた。その直後、最終濃度0.5%BSA及び0.05%Tween20を含む10mM PBS (pH7.2)で至適濃度に希釈したPOD標識抗ノロウイルスポリクローナル抗体を10%便懸濁液が入っているウェルに加え、25℃で2時間反応させた。反応後、ウェルの反応液を吸引除去し、最終濃度0.05%Tween20を含む10mM PBS (pH7.2)をウェルに200 μ l加え、同様に吸引除去した。この操作を少なくとも5回行った。次いで過酸化水素を含むTMB溶液を100 μ l/ウェル加え、室温で30分間反応させた。反応後0.6Nの硫酸を100 μ l/ウェル加え、ELISAオートリーダーでウェルの吸光度(450nm/630nm)を測定した。

【0045】

【表 5】

	検体	吸光度
PVP 0%	VLP124	4.755
	VLP18-3	0.867
	D10	0.203
	D16	0.159
	D17	0.074
PVP 0.2%	VLP124	4.876
	VLP18-3	0.877
	D10	0.173
	D16	0.146
	D17	0.062
PVP 1%	VLP124	4.525
	VLP18-3	0.807
	D10	0.145
	D16	0.120
	D17	0.055
PVP 5%	VLP124	3.615
	VLP18-3	0.721
	D10	0.115
	D16	0.079
	D17	0.041
	BLK	0.084

【0046】

表5から、PVPを添加することにより非特異反応は軽減し、PVPを最終濃度5.0%になるように添加すると、健常人の便検体の吸光度がPVPを添加しない場合に比べ最大2倍も低下した。従って、PVP添加は非特異反応軽減に効果があると考えられた。

【0047】

実施例6 検体とPOD標識抗体を同時にマイクロプレートのウェルに加える方法

マウスグロブリンを0.1mg/mL、Triton X100を1%含むアルカリ緩衝液の塩濃度を、1、2、8%加えて検体希釈液を作製した。

【0048】

ノロウイルス患者便(0.5~1.0g)に各検体希釈液10mLをそれぞれ加え、懸濁後10分間静置し、その上清を取り10%便懸濁液とした。この10%便懸濁液を抗ノロウイルスモノクローナル抗体固相マイクロプレートのウェルに

100 μ l 加えた。その直後、最終濃度 0.5% BSA 及び 0.05% Tween20 を含む 10mM PBS (pH 7.2) で至適濃度に希釈した POD 標識抗ノロウイルスポ
リクローナル抗体を 10% 便懸濁液が入っているウェルに加え、25℃で2時間
反応させた。反応後、ウェルの反応液を吸引除去し、最終濃度 0.05% Tween
20 を含む 10mM PBS (pH 7.2) をウェルに 200 μ l 加え、同様に吸引除去し
た。この操作を少なくとも 5 回行った。次いで過酸化水素を含む TMB 溶液を 10
0 μ l/ウェル加え、室温で 30 分間反応させた。反応後 0.6N の硫酸を 100
 μ l/ウェル加え、ELISA オートリーダーでウェルの吸光度 (450nm/630nm)
を測定した。

【0049】

【表 6】

NV3912

健常人便検体	通常法	同時法
DW3	0.211	0.011
DW4	0.091	0.011
DW5	0.124	0.011
DW6	0.084	0.010
D10	0.399	0.009
D16	0.109	0.007
D17	0.189	0.008
D18	0.193	0.009
BLK	0.085	0.013

NS14

健常人便検体	通常法	同時法
DW3	0.083	0.017
DW4	0.061	0.017
DW5	0.074	0.017
DW6	0.057	0.029
D10	0.125	0.026
D16	0.062	0.013
D17	0.095	0.012
D18	0.088	0.013
BLK	0.064	0.019

【0050】

表 6 から、同時にマイクロプレートに加える方法 (検体と POD 標識抗体を同時

にマイクロプレートのウェルに加える方法)は、通常法(検体と固相MAbsとの反応後洗浄し、POD標識抗体を加える方法)に比べると、健常人便検体及びブランクともに吸光度が低かった。従って、ELISAの操作方法としては同時マイクロプレートのウェルに加える方法の方が非特異反を軽減させると考えられた。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 糞便、嘔吐物、体液、血液、体組織、食品等のノロウイルス又はサポウイルス含有検体から、簡便で、遠心分離機等の特別な機器を必要とすることなく、検出感度を向上させ、また非特異因子を完全に除去することを目的とする。

【解決手段】 pH9.0～10.0のアルカリ性緩衝剤を含有するノロウイルス又はサポウイルス検体用希釈液。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号

特願 2003-095349

受付番号

50300532336

書類名

特許願

担当官

第二担当上席

0091

作成日

平成15年 4月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成15年 3月31日

次頁無

特願 2003-095349

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[591125371]

1. 変更年月日

1997年 6月12日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区日本橋茅場町三丁目4番2号

氏 名

デンカ生研株式会社